

## ⑪ 公開特許公報 (A) 昭63-42691

⑫ Int. Cl. 4

C 12 P 13/00  
 A 23 J 7/00  
 // (C 12 P 13/00  
 (C 12 R 1:66)  
 (C 12 P 13/00  
 C 12 R 1:38)  
 (C 12 P 13/00  
 C 12 R 1:845)  
 (C 12 P 13/00  
 C 12 R 1:785)

識別記号

府内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)2月23日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 リン脂質の改質方法

⑮ 特願 昭61-184292

⑯ 出願 昭61(1986)8月7日

⑰ 発明者 八木 隆 千葉県柏市つくしケ丘2-4-5 つくしフラット1階

⑱ 発明者 町田 芳章 東京都江戸川区松江1-9-10-1102

⑲ 出願人 昭和産業株式会社 東京都千代田区内神田2丁目2番1号

⑳ 代理人 弁理士 中島 敏

## 明細書

## 1、発明の名称

リン脂質の改質方法

## 2、特許請求の範囲

(1) リン脂質にアスペルギルス属またはショードモナス属に属する微生物、リゾプス・ジャバニカス、リゾプス・ニベウスおよびムコール・ミハイのうちの一つが生産するリバーゼを作用させ、その少なくとも一部をリゾ型リン脂質とすることとなるリン脂質の改質法。

(2) アスペルギルス属に属する微生物がアスペルギルス・ニガーまたはアスペルギルス・ウェンチである特許請求の範囲第(1)項記載のリン脂質の改質方法。

(3) シュードモナス属に属する微生物がシュードモナス・フルオレッセンスまたはシュードモナス・フレイジである特許請求の範囲第(1)項記載のリン脂質の改質方法。

## 3、発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、リン脂質にリバーゼを作用させ、その少なくとも一部をリゾ型リン脂質とすることとなるリン脂質の改質法に関する。

## (従来の技術)

リゾ型リン脂質とはリン脂質のグリセリン残基に結合した脂肪酸の一部を加水分解して得られる部分分解リン脂質である。かかるリゾ型リン脂質は、水溶性が増加してO/W型の乳化性が強くなり、また、カルシウムやマグネシウム等のイオンが高濃度に共存しても乳化力が低下しない等、優れた特性が付与されることが報告されており (J. Amer. Oil Chem. Soc. 53, 425, 1976)、このものの応用例としてはミルクリプレーザー(文献上記)、マヨネーズの熱安定性の改良 (J. Sci. Food. Agric. 32, 451, 1981)、製パン改良剤(特開昭60-30644)などが知られている。

リン脂質をリゾ型リン脂質に変えるための加水分解の手段には酸、アルカリ等を用いる化学的方法と酵素を用いる方法とがあるが、化学的方法は

分解反応に特異性がないためリゾ型リン脂質の収率が低く、また、反応には高温を必要とし分解生成物が着色する等の不都合があり、現在では殆ど顧みられていない。

リン脂質を分解する酵素としてホスホリバーゼが知られている。該酵素はその作用部位によって更に細分類され、このうちリン脂質をリゾ型リン脂質に分解するにはグリセロール残基の1位および2位に結合した脂肪酸をそれぞれ選択的に加水分解する、ホスホリバーゼA<sub>1</sub>、またはA<sub>2</sub>、もしくは1位および2位の両方を加水分解するホスホリバーゼB活性を有するもののうち、いずれかが必要となる。

ホスホリバーゼAあるいはB活性を有する酵素は、蛇毒や蛇毒中に存在することが古くから知られているが、この他にはすい臓リバーゼ、リゾプス・デレマス (*Rhizopus delemar*)、リゾプス・アルビズ (*R. arrhizus*) やムコール・ジャバニカス (*Mucor javanicus*) 等の少數の微生物起源のリ

バーゼに、その活性の存在が報告されているのに過ぎない。現在、酵素を利用してリン脂質を分解したリゾ型リン脂質も一部市販されているが、これは豚すい臓リバーゼを用いたものであり、微生物起源のリバーゼを用いるリン脂質の改質は未だ工業的に行われていない。

(発明が解決しようとする問題)

本発明は、工業的に入手可能な微生物起源のリバーゼにつき広く検索を行って、リン脂質をリゾ型リン脂質に分解することができる、強いホスホリバーゼAあるいはB活性を有するリバーゼ剤を見出し、もって酵素を用いたリン脂質のリゾ型リゾ脂質への変換による改質に実用化の道を開こうとするものである。

(発明の構成)

本発明は、リン脂質にアスペルギルス属またはショードモナス属に属する微生物、リゾプス・ジャバニカス (*Rhizopus javanicus*) リゾプス・ニベウス (*Rhizopus niveus*) およびムコール・ミーハイのうち

- 3 -

の一つが生産するリバーゼを作用させ、その少なくとも一部をリゾ型リン脂質とすることを特徴とするリン脂質の改質方法である。アスペルギルス属に属する微生物としてはアスペルギルス・ニゲー (*Aspergillus niger*) またはアスペルギルス・ウエンチ (*Aspergillus wentii*) が、ショードモナス属に属する微生物としてはショードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) またはショードモナス・フレイジ (*Pseudomonas fragi*) の生産するリバーゼが、高いホスホリバーゼ活性を有するので特に有利である。これらの微生物の生産する酵素は市販されているものが多く、本発明においてもこれらを利用することができる。

これら微生物から取得したリバーゼ剤のホスホリバーゼ活性は、その起源によりリン脂質の1位脂肪酸を優先的に加水分解するものと、1および2位脂肪酸の両方をほぼ均一に加水分解するものとがあり、前者の例としてはアスペルギルス・ニ

- 4 -

ゲー、リゾプス・ジャバニカス、リゾニベウスの生産するリバーゼがあり、後者の例としてはショードモナス・フルオレッセンス、リゾフレイジがある。リゾ型リン脂質のみを多量に生成させるためには、前者タイプのリバーゼを使用するのが有利である。

かかる酵素を作用させてリゾ型リン脂質を得るためのリン脂質原継としては、例へば大豆レシチン、卵黄レシチン等の動植物起源の市販レシチンの他、植物油の精製工程の一つである脱脂工程で得られる、所謂抽出油滓をも用いることができる。反応は、水、または酵素に至適なpHの緩衝液にリゾ脂質1～50重量%の濃度に分散し、この分散液にリン脂質1g当たり、山田らの方法 [日本農芸化学会誌 36, 860, 1962] により測定したリバーゼ活性が1～100000ニットに相当する量のリバーゼを加え、反応液を振動させつつ20～60℃で、より好ましくは25～40℃で3～24時間反応させるのがよい。

所定時間経過した反応液は、例へば製パンへの

利用ではこれをそのまま生地の混捏水として使用することもできるが、一般的には必要に応じ加熱等によりリバーゼを失活せしめ、更に必要に応じ薄層澱粉等の適宜の澱粉機による澱粉、更には噴霧乾燥、凍結乾燥等の適宜の乾燥手段を施して、澱粉もしくは乾燥製品とすることもできる。

以下実施例により具体的に説明する。

(実施例)

実施例 1

リン脂質 1-パルミトイ 2-オレイルホスファチジルコリン 1.0 mg および表 1 に挙げた各微生物起源の市販リバーゼ剤 4.00 ユニットを、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 ml に分散し、37 °C 恒温槽中で攪拌はんじつ 3 時間反応させた。経時後反応液を凍結乾燥し、このもののクロロホルム-メタノール (2:1) 抽出液に内部標準物質としてステアリン酸 2 mg を加え、シリカゲル薄層板にスポットして、クロロホルム:メタノール:水 (6.0:3.0:3) を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行った。展開後、避難脂肪防

脂区分およびリゾホスファチジルコリン区分をそれぞれ採取取り、前者については三ツッカ化メタノール法で脂肪酸をメチルエステル化後、ガスクロマトグラフィーによりパルミチン酸とオレイン酸の定量を行い、後者についてはこれを過塩素酸分解後リンの定量を行ってリゾホスファチジルコリンの生成量を算出した。結果を表 1 にまとめる。

表 1

起源微生物	生成量 (mols)	避難脂肪防組成 (mols) 百分率
酵素剤名 (上段) ④FPC		(上段) パルミチン酸
【リバーゼ】	【下段】避難脂肪酸	(下段) オレイン酸
アスベルギヌス-ニギ	8.7	7.5
リバーゼ	1.02	2.5
【天野製薬】		
アスベルギヌス-ウエンチ	2.5	6.0
培養液*	4.0	4.0
リバーゼ FPC (天野製薬)	2.1	4.9
リバーゼ F (天野製薬)	9.7	5.1
メドモナス-フレイ	1.0	5.5

- 7 -

リバーゼ F (リバーゼ F)	4.0	4.5*
リバーゼ-ジャニカス	1.2	8.5
リバーゼ (天野製薬)	1.3	1.5
リゾプス・ニベウス	3.0	8.2
長瀬リバーゼ (長瀬産業)	3.5	1.8
コールミハイ	4.2	6.3
リバーゼ SP-225 (米国ノボ社)	5.9	3.7
リバーゼ-シリンドラセア	0	—
リバーゼ NY (名糖産業)	0	—
リバーゼカツウ-ビスコサム	0	—
リバーゼ (東洋醸造)	0	—
アスロバクター-ユ リアフィエンス	4	4.8
リバーゼAU (新日本化学)	1.6	5.2

\* 1 F O 8 8 6 4 菌株を H. Chanderla (J. Food Sci. 45, 598, 1980) に従じて培養、菌体を遠心除去したものの。

表 1 に見られるように、本発明に係るアスベルギルス種およびショードモナス属に属する微生物、リゾプス・ジャニカス、開ニベウス、ムコール

・ミーハイから取得したりバーゼ剤は、いずれもホスホリバーゼ活性を有し、リン脂質 1-パルミトイ 2-オレイルホスファチジルコリンに作用してリゾ型リン脂質であるリゾホスファチジルコリン (表中リゾ P C と略記) を生成した。

一方、キャンディダ・レリンドラセア、クロモバクテリウム・ビスコサム、アースロバクター、ユーリアフィエンス等の生産するリバーゼにはホスホリバーゼ活性が殆どないか、あるいは極めて微弱なものであり実用化の可能性はなかった。

また、ホスホリバーゼ活性を有するリバーゼ剤においても、その作用機作によってリゾホスファチジルコリン生成能にかなりの差があり、リゾ型リン脂質を多量に生成させるには、特にリン脂質の 1 位脂肪酸を優先的に分解するタイプ (表 1 中の避難脂肪防組成の欄でパルミチン酸 (1 位脂肪酸) がオレイン酸 (2 位脂肪酸) より多いもの) のリバーゼ剤の使用が好ましいことが示唆された。

実施例 2

大豆リン脂質 (独スターングルミー社製スター

バーピーM) の 1.0% (W/W) 調衡液 + 分散液 50 g に表 2 に記載の微生物起源のリバーゼ各 1.0% ユニットを加え、ロータリーシェーカー中 3.7 度で 24 時間反応させた。

## \* 調衡液

レュードモナス・フルオレッセンス、同フレイジ、リブロス・ジャバニカス、同ニベウス生産の酵素剤については 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 、アスペルギルス・ニガ・生産の酵素剤については 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) を使用。

経時後、凍結乾燥を行い、そのクロロホルム-メタノール抽出物につき、クロロホルム-メタノール水 (65: 25: 4) およびブタノール-酢酸-水 (60: 20: 20) の 2 種の展開溶媒を用いた二次元薄層クロマトグラフィーを行った。ホスファチジルコリン (PC) 、ホスファチジルエタノールアミン (PE) 、リブロスファチジルコリン (リブロPC) およびリブロスファチジルエタノールアミン (リブロPE) の各区分を擇き取り、

それぞれにつき過塩素酸分解後リンの定量を行ってこれらの組成比を求めた。結果を表 2 に示す。

表 2 に見るように、基質に大豆リン脂質を用いた場合にも、本発明に係る微生物起源のリバーゼはいずれもリブロ型リン脂質を生成するが、

(リブロPC + リブロPE) / (PC + PE + リブロPC + リブロPE)

で算出した「リブロ化率」は、アスペルギルス・ニガ・が最も大きく、以下リブロス・ジャバニカス、ムコール、ミーハイ、リブロス・ニベウス、レュードモナス・フルオレッセンスおよび同フレイジの順で、リブロ型リン脂質を得るには 1 位脂肪酸に優先的に作用するタイプのリバーゼの使用が望ましいという先の実施例 1 の結果を裏付けるものであった。

表 2. 大豆リン脂質リバーゼ分解物の組成 (%)

起源	リブロ				リブロ化率 B+D
	PC (A)	PC (B)	PE (C)	PE (D)	
微生物					

- 11 -

酵素剤名 [リバーゼ]	23.0	0.8	28.5	0.7	0.03
未分解					
大豆リン脂質					
アスペルギルス・ニガ・ [リブロ-DA]	4.0	13.5	1.0	4.10	0.78
(天野製薬)					
レ・モナス	19.1	3.3	28.6	2.0	0.10
フルオレッセンス [リブロ-FL]					
リブロス・ニベウス [リブロ-NS]					
(天野製薬)					
レ・モナス・フレイ [リブロ-DM+FL]	22.8	1.9	24.1	1.5	0.07
(天野製薬)					
リブロス・ジャバニカス [リブロ-JB]	7.3	10.5	16.6	5.1	0.39
(天野製薬)					
リブロス ニベウス	11.5	7.9	14.4	5.9	0.35
長嶋リブロ					

長嶋産業】	リブロ	リブロ	リブロ化率 B+D
ココス・エーハイ	9.4	9.4	15.3 4.2 0.36
リブロ-ESP-225			
【米国リブロ社】			

注)

PC: ホスファチジルコリン、  
リブロPC: リブロホスファチジルコリン、  
PE: ホスファチジルエタノールアミン、  
リブロPE: リブロホスファチジルエタノールアミン

表 3. 酪黃リン脂質リバーゼ分解物の組成 (%)

起源	リブロ				リブロ化率 B+D
	PC (A)	PC (B)	PE (C)	PE (D)	
微生物					
酵素剤名 [リバーゼ]					
未分解	72.3	0.9	23.8	0.9	0.02
酪黃リン脂質					
アスペルギルス・ニガ・ [リブロ-DA]	28.7	20.3	8.2	3.7	0.39
(天野製薬)					

〔天野製薬〕					
ショウガオイ	41.4	5.0	13.0	1.5	0.09
フルオリヤセニス					
〔リバーゼP〕					
〔天野製薬〕					
ショウガオイ・ナス・フレイ	61.1	3.7	18.3	1.8	0.08
〔リバーゼP・オイ・ゼロ〕					
〔リバーゼP・ゼロ〕					
リバーゼ・ショウガオイ	58.6	7.7	15.5	4.1	0.41
〔リバーゼP〕					
〔天野製薬〕					
リバーゼP	51.8	10.2	17.9	3.5	0.16
・ニベウス					
〔長瀬リバーゼ〕					
〔長瀬産業〕					
リコル・ミルハイ	52.4	7.4	15.0	2.8	0.13
〔リバーゼSP-225〕					
〔米園ノゾ社〕					

注) P.C: ホスファチジルコリン、  
リバーゼP: リバーゼホスファチジルコリン、

- 15 -

者リバーゼによる分離反応が正常に行われることが分かった。

表4. 実験例4のリバーゼ分解物の組成(%)

P.C	リバーゼP.C	P.E	リバーゼP.E	リバーゼ化率
(A)	(B)	(C)	(D)	(B+D)/(A+B+C+D)
8.0	8.1	7.2	5.9	0.48
...	...	...	...	...

#### 実験例5

本発明の方法で得た分解物の乳化力を次のとおり試験した。

本発明の方法によるリン脂質として実験例4で得た商業分解物の凍結乾燥品を、対照区として未分解大豆レシチンを、各々試料とし、試料各0.5gと表5に記載の各濃度の塩化カルシウム水溶液5mℓを試験管にとり、日音医器医器機製作所製ホモジナイザー「スマコトロン」で4.5m/sシャット用い10,000r.p.m. 2分間分散させ、乳化状態を観察した。

- 16 -

表5

Ca濃度(mM)	0	1.0	2.0	4.0	6.0
実験例4による	○	○	○	△	×
商業分解物					
未分解大豆レシチン	○	○	×	×	×

○: 均一に乳化 ×: 乳化せず

△: 均一に乳化するが数分で分離

以上のように、本発明による待機処理レシチンは、未処理レシチンでは乳化力が殆どないイオン強度の高い系においても優れた乳化力を発現することが示された。

#### (発明の効果)

本発明によれば、工業的に入手が可能な市販の微生物起源のリバーゼ剤を用い、広範な原料リン脂質をリバーゼ型リン脂質に改質することができる。該リバーゼ型リン脂質は特に水分散液における乳化性に優れた物質であり、このものを安価に提供することを可能とした本発明は、特に食品工業を中心

心に産業面に多大の貢献を果たすものである。

特許出願人　　昭和産業株式会社  
代理人　　中　島　　<sup>明治</sup>  


- 19 -